

# 福島県立医科大学 学術機関リポジトリ



Title	HCV感染を防ぐ新規阻害抗体の開発( 本文 )
Author(s)	岡井, 研
Citation	
Issue Date	2016-03-24
URL	<a href="http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/1328">http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/1328</a>
Rights	This is the pre-peer reviewed Japanese version of "Oncotarget. 2018 Mar 30;9(24):16588-16598. doi: 10.18632/oncotarget.24742. © 2018 Okai et al.", used under CC BY 3.0
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2023-05-05T08:14:02Z

# HCV 感染を防ぐ新規阻害抗体の開発

分子細胞病理学分野

岡井 研

# 要旨

## 【背景と目的】

Hepatitis C virus (HCV) 感染は高率に慢性化して肝硬変や肝臓に至る難治性疾患であり、本邦における感染者数は約 200 万人と推定されている。最近 direct-acting antivirals (DAAs)が新規 HCV 治療薬として導入されているが、DAA 抵抗性 HCV 変異体の出現が報告されている。また、既存の HCV 治療薬は全て HCV 持続感染後の増殖抑制を目的としたものであり、HCV の感染予防法は未だ確立されていない。一方 HCV は、各遺伝子型共通の侵入過程を経て宿主である肝細胞に感染すると考えられていることから、HCV 侵入に関わる宿主因子は有望な予防・治療標的である。そこで今回私は、HCV の感染成立に必須であるタイト結合分子オクルディンに着目し、新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製した。本研究では、本抗体が HCV 感染を防ぐ予防薬として有用かを *in vitro* で検討するとともに、その感染阻害メカニズムの解明を目指した。

## 【方法】

オクルディンのヒト特異的 HCV 感染感受性を担う第 2 細胞外ドメインのうち、アミノ酸配列 214-230 部位を抗原とし、マウス抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製した。抗体の抗原ペプチドへの結合性は、ELISA 法でスクリーニングした。抗オクルディン抗体による HCV 感染阻害効果は、高分化型ヒト肝臓由来細胞株 Huh7.5.1 の単層培養系、ダブルチャンバー培養系、マトリゲル 3 次元培養系を用いて評価した。また HCV 感染には、HCV エンベロープタンパク質を被った HCVpv と、実験室 HCV 株である HCVcc を用いた。本抗体の細胞傷害の有無については XTT 細胞増殖アッセイ法にて検討した。さらに本抗体の構造や作用機序を明らかにするために、アイソタイプ及びエピトープ解析を行い、蛍光免疫染色にて抗オクルディン抗体投与による内在性オクルディンの局在変化を観察した。

## 【結果と考察】

抗オクルディン抗体のサブクローン 15 種類はいずれも明らかな抗原結合能を有していたが、単層培養系では HCV 感染阻害効果を示さなかった。しかし、生体における肝細胞環境や HCV 感染ルートをより再現したダブルチャンバー培養系やマトリゲル 3 次元培養系では、新規抗オクルディン抗体が HCV 感染を有意に阻害した。また本抗体は、細胞毒性を示さなかった。抗体のアイソタイプは IgG1/λであり、エピトープは 2 つのヒト特異的アミノ酸 (A214, L215)を含む 214-217 部位 (ALCN)であることが示唆された。さらに新規抗体は HCV の存在の有無に関わらず、オクルディンの局在をタイト結合領域から細胞質内に変化させた。このことから、本抗体はオクルディンのエンドサイトーシスを誘導して HCV や他の宿主因子との会合を回避させ、HCV 感染成立を防ぐと考えられた。

## 【結論】

本研究では、*in vitro* で HCV 感染阻害効果を有する抗ヒトオクルディン抗体を開発した。本抗体は、想定される作用機序からウイルスの遺伝的背景に無関係に作用すると考えられる。本抗体は将来、母子感染や針刺し事故、肝移植に際した新規 HCV 感染予防薬として用いられることが強く期待される。

## 序論

世界における慢性 C 型肝炎患者は、1 億 3000～1 億 7000 万人と試算されている(1)。一方、我が国における hepatitis C virus (HCV) 感染者数は約 190 万～230 万人と推定され、年間約 3 万人の HCV 感染者が発見されている(2)。HCV 初感染者の約 70%は持続感染を来し、慢性肝炎を経て肝硬変や肝臓に至り年間 3 万人以上が死亡している。また肝臓は本邦の部位別がん死亡数の第 5 位を占めるに至っており、その原因の 80%が HCV 由来である(3)。このような状況から、HCV の感染予防と治療法の確立は喫緊の課題である。

HCV の初感染は、血流に運ばれたウイルスが肝臓の血管内皮細胞を通過した後、肝細胞に吸着、侵入することにより成立すると考えられている。肝細胞内に侵入したウイルス粒子より RNA が放出されると前駆体ポリペプチドの翻訳が開始され、構造蛋白であるコア蛋白とエンベロープ蛋白 E1, E2 や、非構造 (NS; nonstructural) 蛋白でウイルス複製に必須なプロテアーゼ、ヘリカーゼ、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼなどがプロセッシングされる(4-7)。これらの非構造蛋白は宿主因子とともに複製複合体を形成しゲノム RNA 複製を行い、NS5A 蛋白と新生された HCV RNA の複合体がコア蛋白と結合し、ヌクレオカプシドが形成される。さらに ER においてエンベロープ蛋白に覆われ、ウイルス粒子の成熟を経てトランスゴルジを介した経路にて細胞膜へ到達し、細胞外へ放出される。この一連の生活環を通して HCV は感染～増殖を繰り返していく。

本邦では現在、C 型慢性肝炎のうち要件を満たす症例において、インターフェロンと抗ウイルス薬リバビリン及び NS3/4A プロテアーゼ阻害剤シメプレビルやバンプレビルによる 3 剤併用療法が行われている(8, 9)。また 2014 年には、新規 direct-acting antivirals (DAAs) (10-12)として NS5A 複製複合体阻害剤ダクラタスビル及び NS3/4A プロテアーゼ阻害剤アスナプレビル併用療法といった、経口薬のみによる C 型慢性肝炎及び C 型代償性肝硬変の治療が導入され、その成績は良好である(13)。しかし既に、多種類の DAA 抵抗性 HCV 変異体が報告されており(14, 15)、また肝移植後の HCV 再感染に対する治療薬としては免疫抑制剤との相互作用などが問題点となっている。さらにこれらの HCV 治療薬は全て HCV 持続感染後の増殖抑制を目的としたものであり、HCV の主感染経路である血液を介した垂直感染（母子感染）や水平感染（針刺し事故など）を予防するワクチンや免疫グロブリンは未だ確立されていない。このように HCV の感染予防が困難な主な理由として、エンベロープタンパク産生に関わる遺伝子(E2/NS-1 領域)が変異しやすく、中和抗体が作成できないことが挙げられる。そのため、宿主因子を標的とした治療薬の開発が強く望まれている。

HCV はジェノタイプに関わらず、共通の侵入過程を経てクラスリン依存性エンドサイトーシス機構によって肝細胞内に取り込まれると考えられており(16, 17)、HCV 侵入に関わる宿主因子は有望な予防・治療標的である。これまでに多くの宿主侵入因子が同定されているが(7, 17, 18)、中でもテトラスパニンファミリー分子である

CD81 (19)、スカベンジャー受容体クラス B タイプ I (SR-BI) (20)、タイト結合分子であるクローディン-1 (21) とオクルディン (22, 23) は HCV の感染成立に必須である (図 1A)。またこれら 4 因子のうち、CD81 とオクルディンはヒト由来でなければ HCV 侵入因子として機能せず、種特異性が知られている。実際、4 因子を過剰発現させたマウス線維芽細胞は HCV に対して高い感染性を獲得する (23)。さらにこれまで、HCV 感受性を示す種はヒトとチンパンジーのみに限られていたが、ヒト CD81 とヒトオクルディンを発現させたトランスジェニックマウスでは HCV 感染が可能となり、HCV の全生活環を再現できる HCV モデル小動物として着目されている (24)。しかし、これらの宿主因子がどのように HCV と相互作用して宿主細胞に取り込まれるかについては不明な点が多く、HCV 侵入の詳細なメカニズムは未だ明らかでない。

HCV の感染・増殖の場である肝細胞において、タイト結合はアピカル（毛細胆管）面とバソラテラル（類洞）面の間をシールし、血液胆汁閥門を形成している。オクルディンはタイト結合に局限する 4 回膜貫通蛋白質であり、N 末端側及び C 末端側の細胞内ドメイン、各々 54 個と 48 個のアミノ酸からなる 2 つの細胞外ドメインを有している (25)。このうち第 2 細胞外ドメインがオクルディンの種特異的 HCV 感受性を担う (23, 26)。オクルディン第 2 細胞外ドメインのアミノ酸配列をヒトとマウスで比較すると、6 個のヒト特異的アミノ酸 (S203, L207, A214, L215, A223, A224) が存在する (図 1B)。これらのアミノ酸の中では、223 番と 224 番目のアラニンがヒトオクルディンの HCV 感受性に重要な役割を果たすことが報告されている。また細胞が HCV 感染すると、オクルディンは HCV と相互作用して小胞体へ集積することが知られている (27)。しかしながら、オクルディンが HCV と直接結合するという知見はなく、オクルディンと他の宿主因子との関係も依然不明である。そこで本研究では、HCV 侵入の最終段階に関わるとされるヒトオクルディンに着目し、その第 2 細胞外ドメインに対する単クローン抗体を作製した。この新規抗ヒトオクルディン抗体が波打ち際で HCV 感染を予防できるかを *in vitro* で検討するとともに、その感染阻害メカニズムの解明を目指した。

## 材料と方法

### 抗ヒトオクルディン単クローン抗体の作製

抗原はヒトオクルディンのアミノ酸配列 214–230 部位 (ALCNQFYTPAATGLYVD) とし、ペプチドの合成を行った。次に、抗原刺激性を高めるため、キャリアタンパク質として N 末端に keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合させた。抗体の作製はハイブリドーマ法により行った。マウス 4 匹の皮下に抗原を 2 週間毎に計 4 回免疫し、その後脾臓を採取し、B 細胞を回収した。回収した B 細胞とマウスミエローマ P6 細胞を融合させ、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの培養上清を回収し、抗原ペプチドへの結合性を ELISA 法によってスクリーニングした。次に、HCV 感染阻害傾向が見られた培養上清について、限界希釈法によりサブクローンを得た。HCV 感染阻害傾向が認められたクローンを培養し、培養上清を回収後、Ab-Rapid PuRe アフニティゲル (プロテノバ) を用いて抗体精製を行った。得られた抗体量は、BCA 法により測定した。

### 抗体アイソタイプ解析

Iso Strip マウスモノクローナル抗体アイソタイプピングキット (Roche) を用いて解析した。1 mg/ml の抗オクルディン抗体 67-2 をディベロプメントチューブに滴下し、攪拌後、アイソタイプ用ストリップを浸漬した。5 分後に、ストリップ部分に検出される青色バンドから、アイソタイプを決定した。

### 抗体エピトープ解析

抗原ペプチドのアミノ酸配列 (ALCNQFYTPAATGLYVD) をもとに、末端側から 7 残基を削った N 末端 (Ocln1; ALCNQFYTPA)、C 末端 (Ocln2; TPAATGLYVD) ペプチドと、両端側から 3~4 残基を削った中心 (Ocln3; QFYTPAATGL) ペプチドを作製した。各ペプチドと KLH がコンジュゲートされた抗原ペプチドは抗原感作マイクロプレート (Nunc) に同モル比で加え、室温下で一晩インキュベートした。5% BSA/PBS/0.09% NaN<sub>3</sub> にて 37 °C、2 時間ブロッキング後、抗ヒトオクルディン抗体クローン 67-2 または正常マウス IgG を加え、室温で 1 時間インキュベーションした。PBS にて洗浄後、二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP) 標識されたヤギ抗マウス IgG (MBL) を加え、室温、1 時間インキュベーションした。PBS で洗浄後、TMB 試薬にて呈色反応を行った。1 M リン酸にて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーにて 450 nm/655 nm の吸光度を測定した。

### 試薬および抗体

抗ヒト CD81 抗体 (以下抗 CD81 抗体) (JS-81 クローン、BD Pharmingen)、正常マウス IgG (以下 IgG) (Jackson Immuno Lab) を使用した。

## 細胞培養

本研究には、HCV 複製の感受性が高い高分化型ヒト肝癌由来細胞株 Huh7.5.1 細胞株（大阪大学微生物研究所 松浦教授より供与）を用いた。Huh7.5.1 細胞は D-MEM high Glucose (Sigma)、10% FBS (GIBCO) の培養液にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。また、細胞の継代は 0.25% トリプシン-EDTA 液を用いて行った。

ハイブリドーマ細胞の培養は RPMI (WAKO)、20% FBS (GIBCO)、1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO) の培養液にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

## HCV 感染阻害評価

### 抗オクルディン抗体の HCVpv 感染阻害効果の評価

HCV エンベロープ蛋白質を被った VSV（水泡性口内炎ウイルス）である HCVpv シュードタイプウイルス (pseudotyped HCV) として、con1 (genotype 1a)、H77 (genotype 1b) および 9-3 (genotype 1b) の 3 種(28)（大阪大学微生物病研究所 松浦教授より供与）を用いた。

Huh7.5.1 細胞は 48 well 平底プレートで培養し、24 時間後に培地交換をする際に、抗オクルディン抗体産生クローン含有培地 12.5 µl/well もしくは精製した抗オクルディン抗体 20 µg/well (80 µg/ml) を培地に加えた。陰性対照として培地のみの mock 群、陽性対照として抗 CD81 抗体 1.25 µg/well (5 µg/ml) を加えた CD81 群をおいた。1 時間インキュベートした後に HCVpv 15 µl もしくはネガティブコントロールとして HCV エンベロープタンパクを持たない GFP 遺伝子が組み込まれた VSV 15 µl を加え、24 時間後にルシフェラーゼ活性を定量した。培地を除去した後、可溶化液 100 µl を加え、15 分後に 20 µl を採取し、50 µl のルシフェラーゼ基質と混和し、ボルテックス後ルミノメーターで測定した。mock 群に比して 90% 以上の低下が見られた場合、感染阻害効果ありと判定した。

### 抗オクルディン抗体の HCVcc 感染阻害効果の評価

実験室株 HCV として樹立されている JFH-1 株由来の HCVcc (cell cultured HCV ; genotype 2a) (28)（大阪大学微生物病研究所 松浦教授より供与）を用いた。

単層培養系では 24 well 平底プレートに 500 µl の培地を準備し、Huh7.5.1 細胞を 1×10<sup>3</sup> cells/well で播種し、48 時間インキュベートした。培地交換を行い、6 種類の抗体産生クローン含有培地を 25-100 µl/well ずつ投与した。対照として mock 群、抗 CD81 抗体 1.25 µg を加えた CD81 群、正常マウス IgG を 20 µg 加えた IgG 群をおいた。

ダブルチャンバー培養系では 24 well 平底プレートに BD Falcon セルカルチャーインサート（セルロース混合エステル、24 well、pore size 0.4 µm、translucent）を設置し、外側チャンバーに 950 µl、インサート内に 250 µl の培地を加えた。Huh7.5.1 細胞を各インサート内に 1×10<sup>3</sup> cells で播種し、48 時間インキュベートした。培地交換を行い、各抗オクルディン抗体(計 15 クローン) 100 µg を外側チャンバーに投与した。

対照として mock 群、抗 CD81 抗体 2.5  $\mu\text{g}$  を加えた CD81 群、正常マウス IgG を 100  $\mu\text{g}$  加えた IgG 群をおいた(各抗体は外側チャンバーに投与)。

マトリゲル 3 次元培養系は Molina-Jimenez らの方法(29)を改変し培養した。48 well 平底プレートに 50  $\mu\text{l/well}$  のマトリゲル (CORNING) を加え、Huh7.5.1 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well となるよう播種し、200  $\mu\text{l}$  の DMEM 培地を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 6 日間培養した。抗オクルディン抗体を 50  $\mu\text{g}$  投与し、対照として mock 群、抗 CD81 抗体 2.5  $\mu\text{g}$  を加えた CD81 群、正常マウス IgG を 50  $\mu\text{g}$  加えた IgG 群をおいた。

抗体や IgG を投与して 1 時間後に HCVcc (単層培養系では 10  $\mu\text{l}$ 、ダブルチャンバー及びマトリゲル培養系では 5  $\mu\text{l}$ ) を加え、2 時間インキュベート後に培地を取り除き、培地にて 2 回洗浄した。再度培地を加え 24 時間インキュベート後に RNA を抽出し(RNeasy Mini kit, QIAGEN)、Real-time PCR 法により細胞中の HCV RNA を定量した。

### Real-time PCR

逆転写反応とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (TOYOBO) を使用し、メーカープロトコールに従い、Step one リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて行った。逆転写反応は 90°C、30 秒、61°C、20 分、95°C、1 分で行い、PCR 反応は 95°C、15 秒、60°C、1 分を 45 サイクルで行った。

PCR プライマー並びに probe の配列は下記の通りに設計した。

NS5A :Forward 5'-AGTACCACAAGGCCTTTCG-3'

Reverse 5'-CGGGAGAGCCATAGTGG-3',

Taqman probe : 5' (FAM) - CTGCGGAACCGGTGAGTACAC (TAMURA) - 3'

### 蛍光免疫染色

8 well ガラスチャンバープレートに 50  $\mu\text{l/well}$  のマトリゲルを加え、Huh7.5.1 細胞を  $5 \times 10^3$  cells/well となるよう播種し、200  $\mu\text{l}$  の DMEM 培地を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 6 日間培養した。mock、抗オクルディン抗体(50  $\mu\text{g/well}$ )投与群をおき、更に HCVcc 投与の有無で区分した。抗体投与 1 時間後に HCVcc 5  $\mu\text{l/well}$  を投与し、2 時間後または 72 時間後に PBS で洗浄を行い、-20°C メタノールにて 10 分間固定した。2% BSA/PBS で 1 時間室温にてブロッキングを行い、1 次抗体として 2 時間後固定群ではラット抗オクルディン抗体 (生理学研究所 古瀬教授より供与) (30)もしくはラビット抗 ZO-1 抗体 (Zymed)、72 時間後固定群ではラビット抗 NS5A 抗体 (大阪大学微生物病研究所 松浦教授より供与) (31)をシグナルブースター (Beacle) にて 200 倍に希釈し使用した。二次抗体反応は蛍光標識された以下の抗体を用いた。2 時間後固定群ではロバ抗ラット IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)、もしくはロバ抗ラビット IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)、72 時間後固定群ではロバ抗ラビット IgG-Alexa Fluor 488 をそれぞれ PBS で 200 倍に希釈し室温下で 1 時間行った。



その後 DAPI による核染色を室温下で 10 分間行った後、封入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, OLYMPUS) を用いて行った。

#### 細胞傷害性の評価

XTT 法により、抗オクルディン抗体の細胞傷害性を評価した。96 well 平底プレートに 25  $\mu$ l/well のマトリゲルを加え、Huh7.5.1 細胞を  $5 \times 10^3$  cells/well となるよう播種し、100  $\mu$ l の DMEM 培地を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 6 日間培養した。培地のみ (mock)、25、50、100  $\mu$ g/well の抗オクルディン抗体または正常マウス IgG を 1 時間処置した。また HCV 感染の影響を検討する目的で、培地のみ (mock)、50  $\mu$ g/well の抗オクルディン抗体または正常マウス IgG を投与後 1 時間に HCVcc 10  $\mu$ l/well を投与し、2 時間培養した。解析は Cell proliferation assay kit II (XTT) (Roche) を用い、メーカープロトコールに従って実験を行った。

#### 統計解析

エピトープ解析における有意差検定は Student の t 検定を用いて行った。HCVcc 感染阻害実験における有意差検定は Mann-Whitney U 検定にて行い、いずれも  $P < 0.05$  を有意差ありとした。

# 結果

## 抗ヒトオクルディン単クローン抗体の作製

抗原性分析の結果をもとに、4 つのヒト特異的アミノ酸を含む 214-230 部位 (ALCNQFYTPAATGLYVD) を抗原とし、抗ヒトオクルディン単クローン抗体を作製した。ハイブリドーマの培養上清を回収し、抗原ペプチドへの結合性を ELISA 法によってスクリーニングを行ったところ、31 個のポジティブクローンを得た (data not shown)。そこでまず、これら 31 クローンの HCV 感染阻害の有無を評価するために、HCVpv を用いた HCV 感染実験を行った。HCV 感染を阻害する陽性対照として、抗ヒト CD81 抗体を用いた(32)。その結果、70%以上の感染阻害率を示す 6 クローンが得られた(図 2A)。これら 6 クローンは最大 83%の感染阻害傾向が見られたが、ポジティブコントロールの CD81 抗体の 99.8%と比べ低値であった(図 2B, C)。HCVcc による評価系では、6 クローンのうち 5 クローンにおいて 79-85%と一定の感染阻害傾向が見られたが、CD81 抗体の 99.6%に比べて感染阻害が弱かった(図 2D)。

次にこれら 5 クローンについて、限界希釈法により 3 クローンずつ計 15 クローンのサブクローンを樹立した。培養上清に含まれる抗体の抗原への結合性を ELISA 法にて検討したところ、15 クローン全てで抗原への結合能が認められた(図 3)。これら 15 クローンの精製抗体について HCVpv による感染阻害効果を評価したが、最大 55%の感染阻害を示すに留まり、十分な阻害効果は得られなかった (図 4A, B)。

## 抗ヒトオクルディン抗体はダブルチャンバー培養系及びマトリゲル 3 次元培養系において HCV 感染を阻害する

通常の単層培養での HCVpv 及び HCVcc 評価系では、新規抗ヒトオクルディン抗体は明らかな感染阻害効果を示さなかったため、HCVcc と抗体を各々アピカル面とバソラテラル面から投与するダブルチャンバー培養系によって検討した(図 5A)。その結果、15 種類の抗オクルディン抗体のうちクローン 67-2 が顕著に HCVcc 感染を阻害した (図 5B)。67-2 による HCV 感染阻害率は 99.6%と統計的に有意で、CD81 抗体と同等の効果が認められた (図 5C)。生体における肝細胞の HCV 感染経路を模倣するように HCVcc をバソラテラル 面(血管側)から投与した系では、HCVcc の細胞への感染性が大幅に低下し、評価できなかった (data not shown)。

マトリゲルを用いた 3 次元培養系では、毛細胆管様管腔構造を含む肝細胞極性が構築され、HCV に対する感染性も有している(24)。そこで、HCVcc と抗体をバソラテラル面から投与するマトリゲル 3 次元培養系(図 6A)にて検討を行った。その結果、67-2 による HCV 感染阻害率は 95%と統計的に有意で、CD81 抗体と同等の効果がみられた (図 6B)。

## 抗ヒトオクルディン抗体は細胞毒性を示さない

抗オクルディン抗体 67-2 クローンの HCV 感染阻害効果が、細胞傷害によるものではないことを検証するため、マトリゲル 3 次元培養での抗体投与による細胞生存

率の変化を XTT 細胞増殖アッセイ法にて検討した。抗オクルディン抗体 (25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) は、対照の IgG 群と同様に細胞傷害を示さなかった(図 7A)。また、HCVcc 感染 2 時間後でも、抗オクルディン抗体による細胞毒性は認めなかった(図 7B)。このように抗オクルディン抗体 67-2 クロームは、HCV 感染阻害効果を示す濃度では重篤な細胞傷害性が無い事が確認された。

抗ヒトオクルディン抗体クローム 67-2 のエピトープは第 2 細胞外ドメインの 214-217 部位 (ALCN) と示唆された

治療薬としての応用を考慮し、抗オクルディン抗体 67-2 クロームのアイソタイプとエピトープを検討した。まずアイソタイプキットを用いて、抗オクルディン抗体 67-2 クロームのアイソタイプを同定した。その結果、H 鎖は IgG1、L 鎖は  $\lambda$  鎖であることが分かった(図 8A)。次に、抗体のエピトープ解析を、抗原ペプチドのアミノ酸配列(ALCNQFYTPAATGLYVD)をもとに、末端側から 7 残基を削った N 末端 (Ocln1; ALCNQFYTPA)、C 末端(Ocln2; TPAATGLYVD)ペプチドと両端側から 3-4 残基を削った中心(Ocln3; QFYTPAATGL)ペプチドを用いて ELISA 法により検討した。Ocln1 ペプチドは配列中にシステイン残基を有することから、2 量体が形成される。そのため、酸性条件下においても行った。結果として、抗オクルディン抗体 67-2 クロームは酸性条件下での Ocln1 ペプチドとのみ有意に結合することが分かった(図 8B)。また、Ocln2 及び Ocln3 ペプチドとの反応性が見られないことから、抗オクルディン抗体 67-2 のエピトープは ALCN の部位であることが示唆された。

抗ヒトオクルディン抗体クローム 67-2 はオクルディンのエンドサイトーシスを誘導して HCV 感染を阻害する

HCVcc 感染の約 72 時間後の NS5A 蛋白の発現を免疫染色法によって検討したところ、mock 群では約 5-10% の細胞で NS5A 陽性となり HCV 感染が確認された (図 9A)。一方抗オクルディン抗体投与群では、予想通り感染細胞は見られず、タンパクレベルにおいても HCV 感染阻害効果が実証された。次に、新規抗オクルディン抗体投与 3 時間後におけるオクルディンの局在性の変化を検討した。抗オクルディン抗体及び HCVcc 非存在下では、オクルディンはタイト結合領域に局在していた。しかし驚いたことに、抗オクルディン抗体投与群では HCVcc の有無に関わらず、オクルディンの局在がタイト結合領域から細胞質に変化していた (図 9B)。一方、タイト結合膜裏打ち蛋白である ZO-1 の局在は、HCV 感染や抗オクルディン抗体の投与によって変化しなかった (図 9C)。これらの結果から、本抗オクルディン抗体はオクルディン選択的にエンドサイトーシスを誘導して、HCV や受容体群との相互作用を回避させ、感染を阻害することが示唆された。

## 考察

本研究では、ヒトオクルディンの第 2 細胞外ドメインに対するマウス単クローン抗体を作製し、この新規抗オクルジン抗体が抗ヒト CD81 抗体と比べて遜色のなく HCV 感染を阻害することを示した。この結論は、肝細胞極性を考慮したダブルチャンバー培養系およびマトリゲル 3 次元培養系を用いた検討によって導き出された。オクルジンは HCV の肝細胞への侵入過程の最終段階に必要な宿主因子と考えられており、抗オクルジン抗体は言わば波打ち際で HCV 感染を防ぐ治療薬となる可能性を秘めている。

新規抗ヒトオクルジン単クローン抗体による HCV 感染阻害効果は、ダブルチャンバー培養系およびマトリゲル 3 次元培養系では認められたが、通常の単層培養ではみられなかった。この原因は明らかではないが、これらの Huh7.5.1 肝細胞培養系が生体における肝細胞環境や HCV 感染をどれだけ反映しているかによると考えられた。即ちマトリゲル 3 次元培養系では毛細胆管様管腔構造が形成され、アピカル（毛細胆管）面とバソラテラル（類洞）面が区別された肝細胞極性が再現されている(29)。また 3 次元培養系では、HCVcc 及び抗体はバソラテラル側（類洞）側から肝細胞に到達するため、*in vivo* における HCV 感染や感染阻害をより模倣していると考えられた。一方単層培養では肝細胞極性が形成されず、アピカル側から加えた抗体はタイト結合領域に局限するオクルジンにアクセスできない可能性がある。ダブルチャンバー培養系では肝細胞極性を示さないものの、バソラテラル側の外側チャンバーから投与された抗体がオクルジンに作用して HCV 感染を防いだと考えられた。さらに、HCVcc をバソラテラル側から投与したダブルチャンバー培養系では感染効率自体が非常に低下し、評価が困難であった。この原因として、本培養系では生態における血流にあたる培養液の灌流が再現できないため、半透膜を介した感染効率が著しく低下するものと考えた。

一方免疫染色による検討では、Huh7.5.1 細胞のマトリゲル 3 次元培養系におけるオクルジンの局在が、抗オクルジン抗体の投与によって、タイト結合領域から細胞質内に明らかに変化することが明らかになった。別のタイト結合分子である ZO-1 の局在は、本抗体の有無によって変化しなかった。これらの結果から、この抗オクルジン抗体は HCV の有無に関わらず、オクルジンのエンドサイトーシスを選択的に誘導することが強く示唆された。言い換えると、本抗体はオクルジンを一時的に細胞内に取り込ませることによって HCV あるいは他の宿主因子との会合を防ぎ、感染成立を防ぐものと考えられた。この結果から本抗体はウイルスの遺伝的背景に無関係に感染阻害効果を示すことが期待され、今後は HCV の各ジェノタイプへの有効性の評価を予定している。また本抗体のエピトープは 214-217 部位 (ALCN) であることが示唆されたが、このうち 2 つはヒト特異的アミノ酸 (A214, L215) であった。HCV 侵入に重要とされるヒト特異的アミノ酸 (A223, A224) (33) がエピトープに含まれていないことは、本抗体の作用機序が HCV 非依存性であることと矛盾しない

と考える。興味深いことに、種間で良く保存された C216 と C237 が HCV 侵入に必須であること(33)、オクルディンが同一細胞内あるいは隣り合う細胞間で対合するためには 2 つのシステイン間のジスルフィド結合が必要であることが報告されている(34)。本抗体のエピトープには C216 が含まれており、オクルディンの対合を阻害することによって、オクルディンのエンドサイトーシスを引き起こすのかもしれない。しかしながらエピトープ解析では、部分的ペプチド Ocln1 の抗オクルディン抗体 67-2 への結合性は全長のペプチド抗原に比べ低く(図 8B)、全長ペプチドの立体構造を認識する不連続エピトープ(構造的エピトープ)が本抗体の認識部位である可能性も否定できない。今後ファージディスプレイ法を用いたエピトープ解析(35)として、特に 1 ファージによる連続・不連続エピトープのマッピングを検討したい。また、本研究で用いた KLH がコンジュゲートされたペプチドはプレートへの吸着性が高いことが知られており、KLH 非結合全長ペプチドを用いて同様の検討を行う必要がある。さらに ALCN の各アミノ酸を置換したペプチドと抗オクルディン抗体との結合性の解析、ALCN の各アミノ酸を置換したオクルディンを発現する細胞株を用いて抗オクルディン抗体の変異オクルディンに対する結合性やエンドサイトーシス誘導の有無を検討することによって、本抗体の作用機序を結論付ける予定である。

このように抗オクルディン抗体は HCV 感染阻害効果を示すことが分かったが、副作用に関する検討では *in vitro* において明らかな細胞傷害性を認めなかった。HCV 侵入に関わる宿主因子を標的とする単クローン抗体(17, 18, 36)のうち、抗 CD81 抗体と抗クローディン-1 抗体についても Huh7.5.1 肝細胞株やヒト初代肝細胞に対する細胞毒性を示さないことが知られている(32, 37, 38)。ヒト化キメラ(uPA-SCID)マウスを用いた *in vivo* の検討では、抗 SR-BI 抗体と抗クローディン-1 抗体が明らかな副作用を示さない一方(32, 39)、抗 CD81 抗体を高容量で投与すると体重減少及び血清アルブミン値の低下をきたす(40)と報告されている。オクルディンはクローディンファミリーと異なり、タイト結合ストランドの形成には関わらず、オクルディン欠損 ES 細胞から分化した上皮細胞ではよく発達したタイト結合ストランドが観察される(41)。また、オクルディンノックアウトマウスでは重篤な異常を認めない(42)ことを考え合わせると、抗オクルディン抗体は *in vivo* においても重大な副作用は示さないことが期待される。今後 *in vivo* における有効性と安全性の評価が必要である。

今後の展望として、臨床応用を見据えて本抗体の相同性決定領域 (Complementary determining regions; CDRs)をヒト抗体の可変領域に移植 (CDR-grafting)することにより、免疫原性を低減させたヒト化抗体の開発を予定している。将来的には、母子感染や針刺し事故、あるいは C 型肝炎硬変や肝臓における肝移植の際に、抗オクルディン抗体が HCV 感染予防薬として有効性を発揮することが強く期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として実験計画から日々の実験方法にいたるまで終始丁寧なご指導、ご助言を賜りました福島県立医科大学基礎病理学講座、千葉英樹教授、富川直樹講師に深厚なる誠意を表します。また、度重なるディスカッションを通してご助言頂きました井村徹也准教授、田中瑞子助教、柏木維人助教、穂積あゆみ主任医療技師、三浦富子主任医療技師に深く感謝いたします。さらに、博士課程への進学および研究全般にわたる多大なご支援、ご指導を賜りました福島県立医科大学消化器・リウマチ膠原病内科学講座、大平弘正教授に深く感謝しております。また共同研究として様々なご指導、試料提供を頂きました大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野、松浦善治教授、福原崇介助教に深く感謝申し上げます。最後に、MD-PhD 学生として実験遂行に多大なサポートを頂いた渡部哲也医師、ご協力頂いた藤田君、吉田君、辛くも楽しい時間を共に過ごした大学院生諸氏に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

## 追記

本学位論文は修正の上、2018 年 3 月 30 日付で Oncotarget 誌に原著論文として発表しました。

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24742>

## 参考文献

1. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-567.
2. 公益財団法人ウイルス肝炎研究財団. C型肝炎について. 2014.
3. Ministry of Health LaW. Vital Statistics Japan. 2013.
4. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-463.
5. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007;132:1979-1998.
6. Moriishi K, Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front Microbiol* 2012;3:54.
7. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle-an update. *J Hepatol* 2014;61:S3-S13.
8. Hayashi N, Izumi N, Kumada H, Okanou T, Tsubouchi H, Yatsushashi H, Kato M, et al. Simeprevir with peginterferon/ribavirin for treatment-naïve hepatitis C genotype 1 patients in Japan: CONCERTO-1, a phase III trial. *J Hepatol* 2014;61:219-227.
9. 林紀夫 田中宣之. 未治療の genotype1 C 型慢性患者に対するバニプレビル (MK-7009)、ペグインターフェロン  $\alpha$ -2b およびリバビリン併用投与の有効性及び安全性の検討. *肝臓* 2014;55:A35.
10. Feeney ER, Chung RT. Antiviral treatment of hepatitis C. *BMJ* 2014;348:g3308.
11. Manns M, Pol S, Jacobson IM, Marcellin P, Gordon SC, Peng CY, Chang TT, et al. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for hepatitis C virus genotype 1b: a multinational, phase 3, multicohort study. *Lancet* 2014;384:1597-1605.
12. Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Hepatitis C. *Lancet* 2015;385:1124-1135.
13. Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, et al. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* 2014;59:2083-2091.
14. Lontok E, Harrington P, Howe A, Kieffer T, Lennerstrand J, Lenz O, McPhee F, et al. Hepatitis C Virus Drug Resistance-associated Substitutions: State of the Art Summary. *Hepatology* 2015.
15. Catanese MT, Dorner M. Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology* 2015.
16. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006;80:6964-6972.
17. Fofana I, Jilg N, Chung RT, Baumert TF. Entry inhibitors and future treatment of hepatitis C. *Antiviral Res* 2014;104:136-142.
18. Zhu YZ, Qian XJ, Zhao P, Qi ZT. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J Gastroenterol* 2014;20:3457-3467.
19. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
20. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-5025.
21. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*

2007;446:801-805.

22. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009;83:2011-2014.
23. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009;457:882-886.
24. Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, et al. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 2011;474:208-211.
25. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777-1788.
26. Liu S, Kuo W, Yang W, Liu W, Gibson GA, Dorko K, Watkins SC, et al. The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry. *Virology* 2010;407:160-170.
27. Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, Aldabe R, et al. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 2008;48:1044-1053.
28. Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, et al. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 2001;286:263-275.
29. Molina-Jimenez F, Benedicto I, Dao Thi VL, Gondar V, Lavillette D, Marin JJ, Briz O, et al. Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology* 2012;425:31-39.
30. Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 1997;73:222-231.
31. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, et al. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 2005;79:13473-13482.
32. Fofana I, Xiao F, Thumann C, Turek M, Zona L, Tawar RG, Grunert F, et al. A novel monoclonal anti-CD81 antibody produced by genetic immunization efficiently inhibits Hepatitis C virus cell-cell transmission. *PLoS One* 2013;8:e64221.
33. Michta ML, Hopcraft SE, Narbus CM, Kratovac Z, Israelow B, Sourisseau M, Evans MJ. Species-specific regions of occludin required by hepatitis C virus for cell entry. *J Virol* 2010;84:11696-11708.
34. Bellmann C, Schreivogel S, Gunther R, Dabrowski S, Schumann M, Wolburg H, Blasig IE. Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin-redox dependency of the second extracellular loop. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:855-867.
35. Fack F, Hugle-Dorr B, Song D, Queitsch I, Petersen G, Bautz EK. Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *J Immunol Methods* 1997;206:43-52.
36. Zona L, Tawar RG, Zeisel MB, Xiao F, Schuster C, Lupberger J, Baumert TF. CD81-receptor associations--impact for hepatitis C virus entry and antiviral therapies. *Viruses* 2014;6:875-892.
37. Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glauben S, Xiao F, Fafi-Kremer S, Soulier E, et al. Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;139:953-964, 964 e951-954.
38. Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, et al. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus



Infection in a Mouse Model. *J Virol* 2015;89:4866-4879.

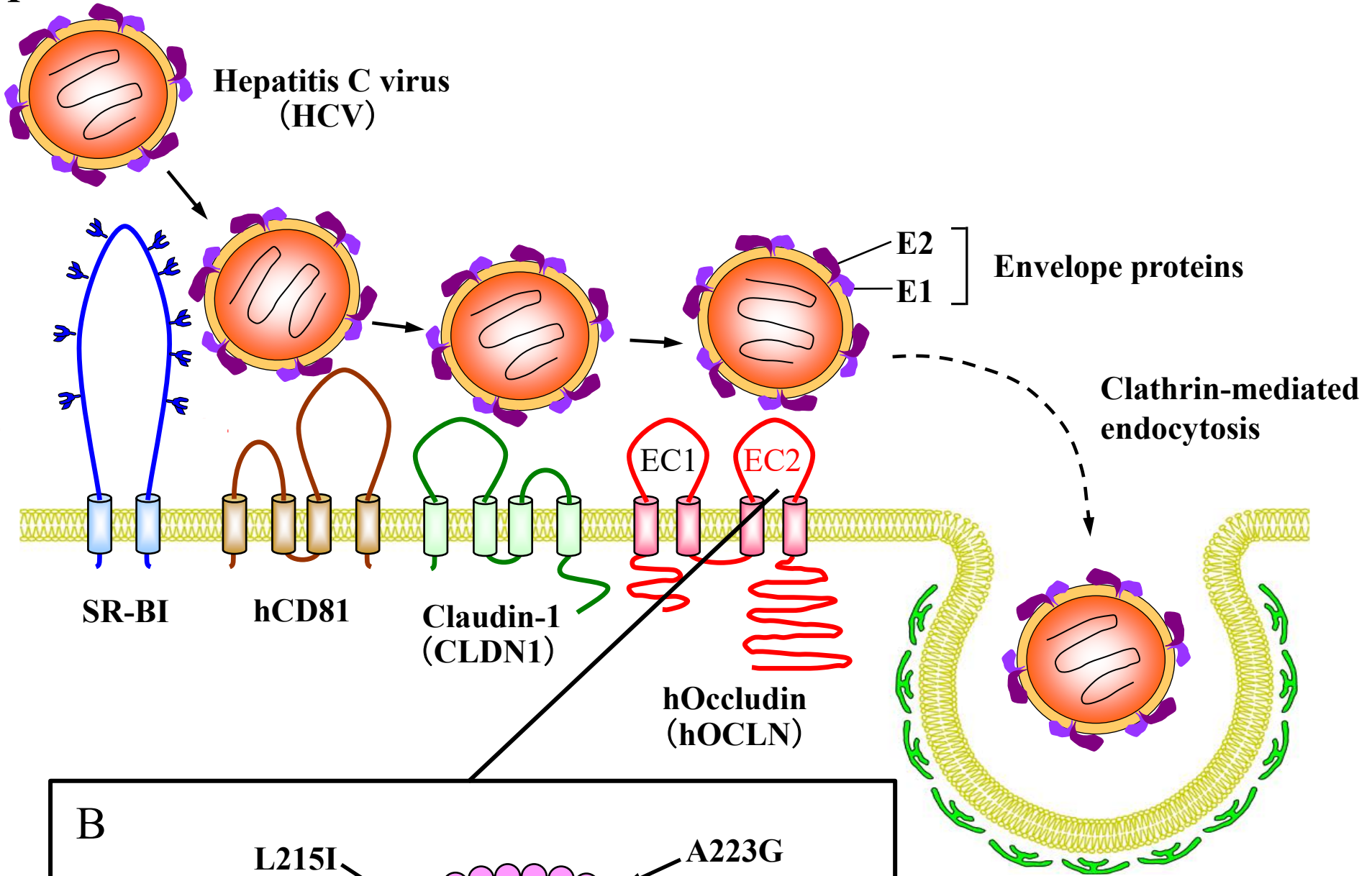
39. Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, Desombere I, Farhoudi A, Jones CT, Sheahan T, et al. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* 2012;55:364-372.

40. Ji C, Liu Y, Pamulapati C, Bohini S, Fertig G, Schraeml M, Rubas W, et al. Prevention of hepatitis C virus infection and spread in human liver chimeric mice by an anti-CD81 monoclonal antibody. *Hepatology* 2015;61:1136-1144.

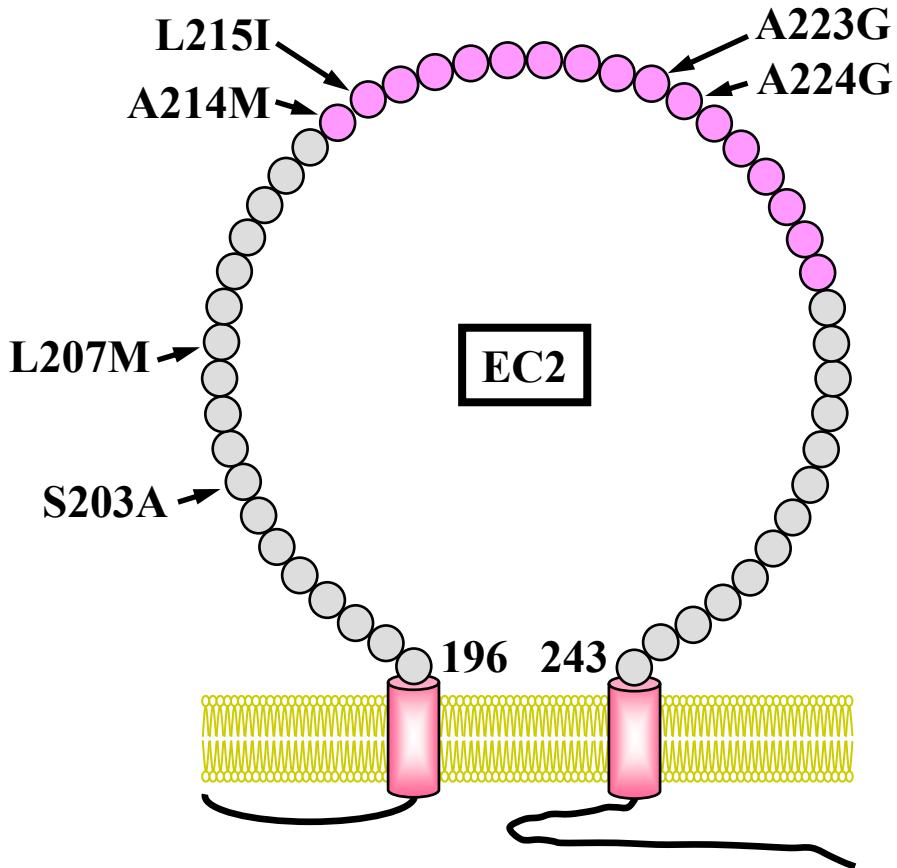
41. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 1998;141:397-408.

42. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11:4131-4142.

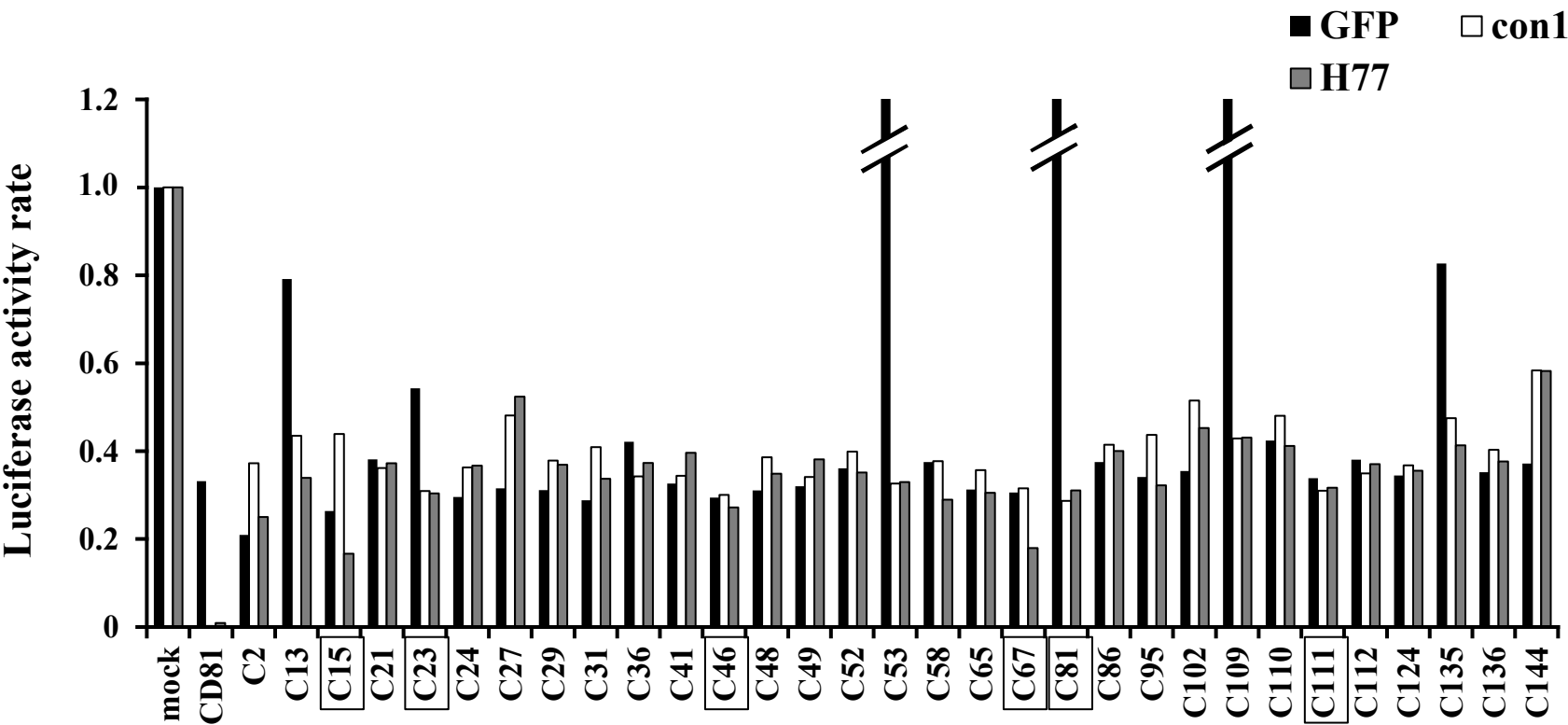
A



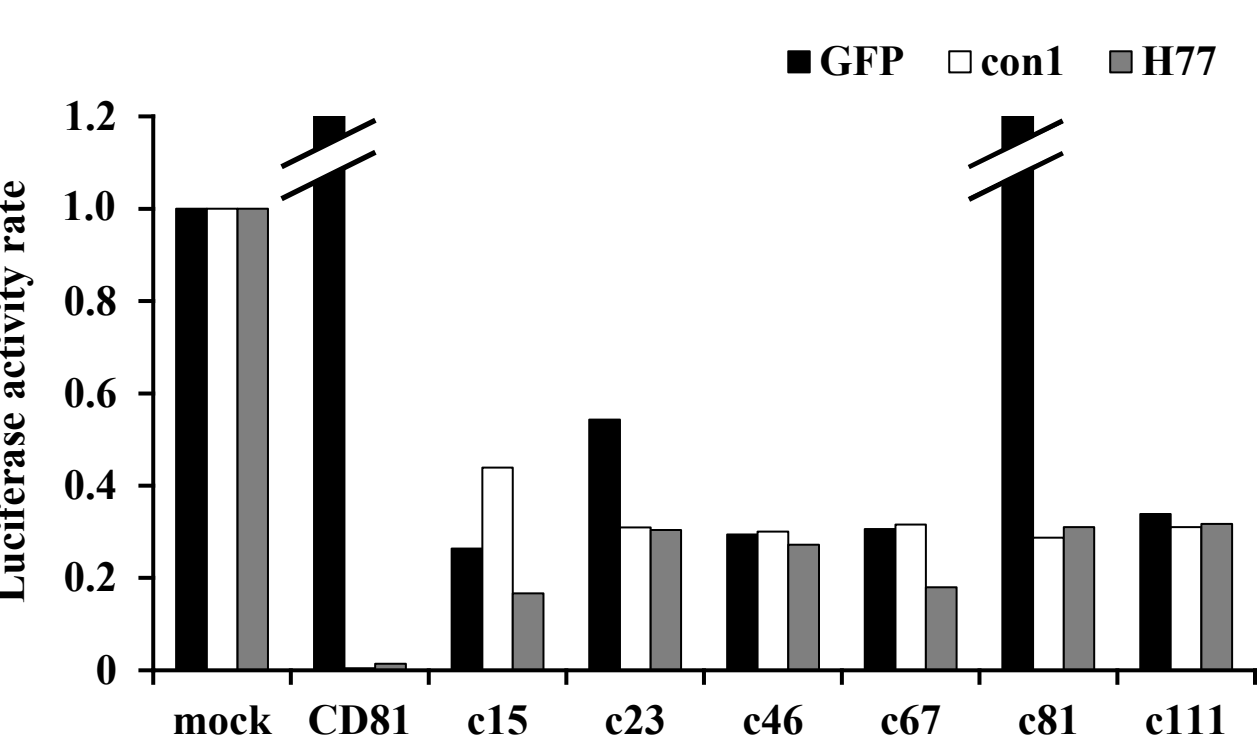
B



A



B

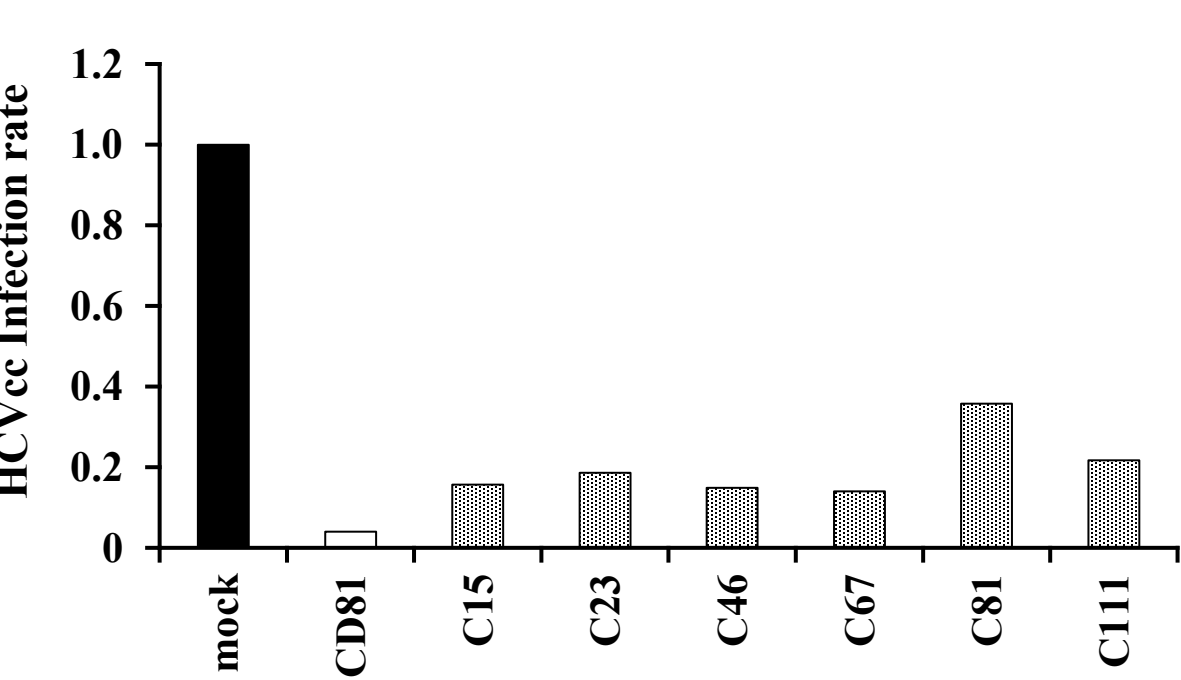


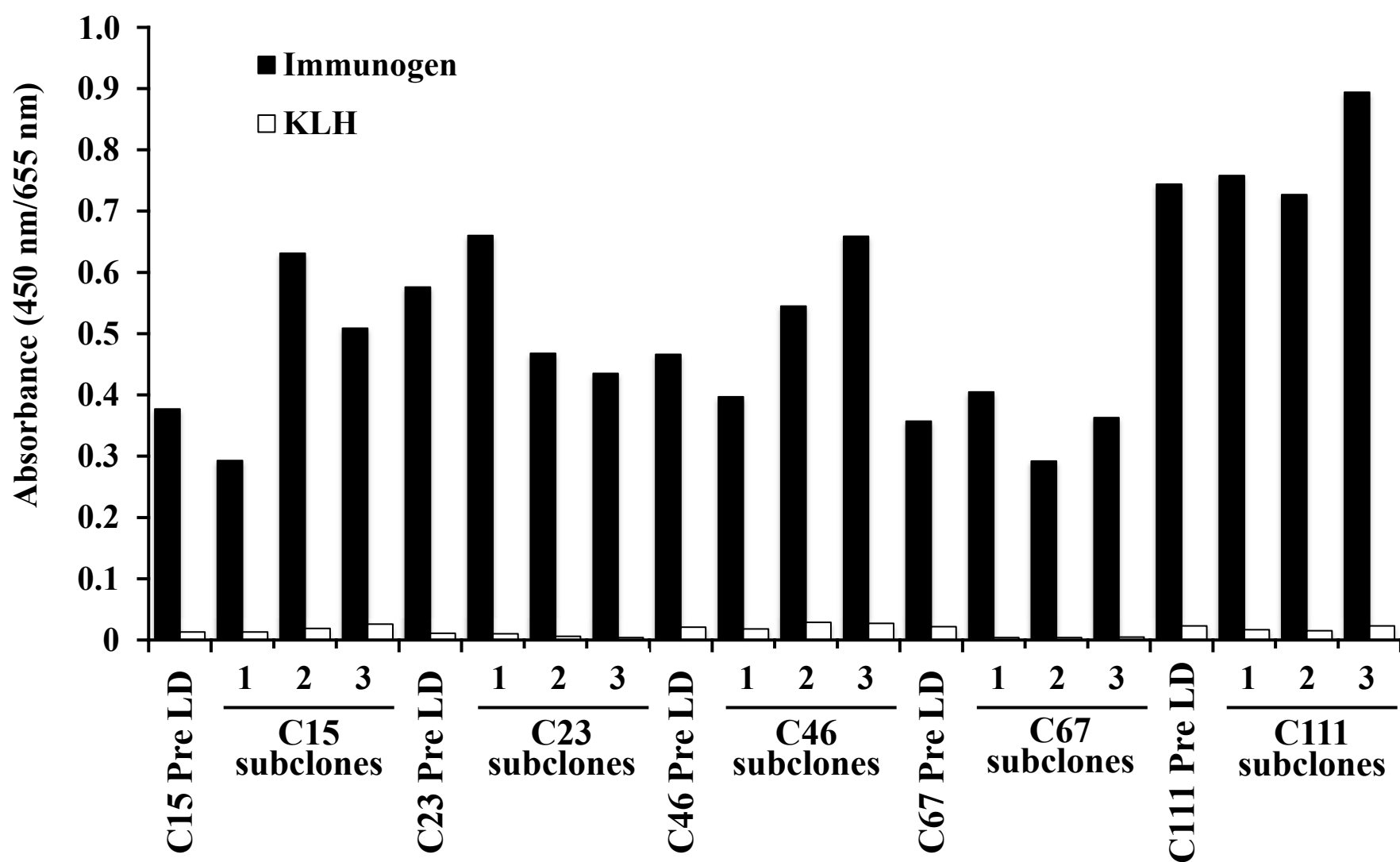
C

	con1	H77
C15	56 %	83 %
C23	69 %	70 %
C46	70 %	73 %
C67	68 %	82 %
C81	71 %	69 %
C111	69 %	68 %

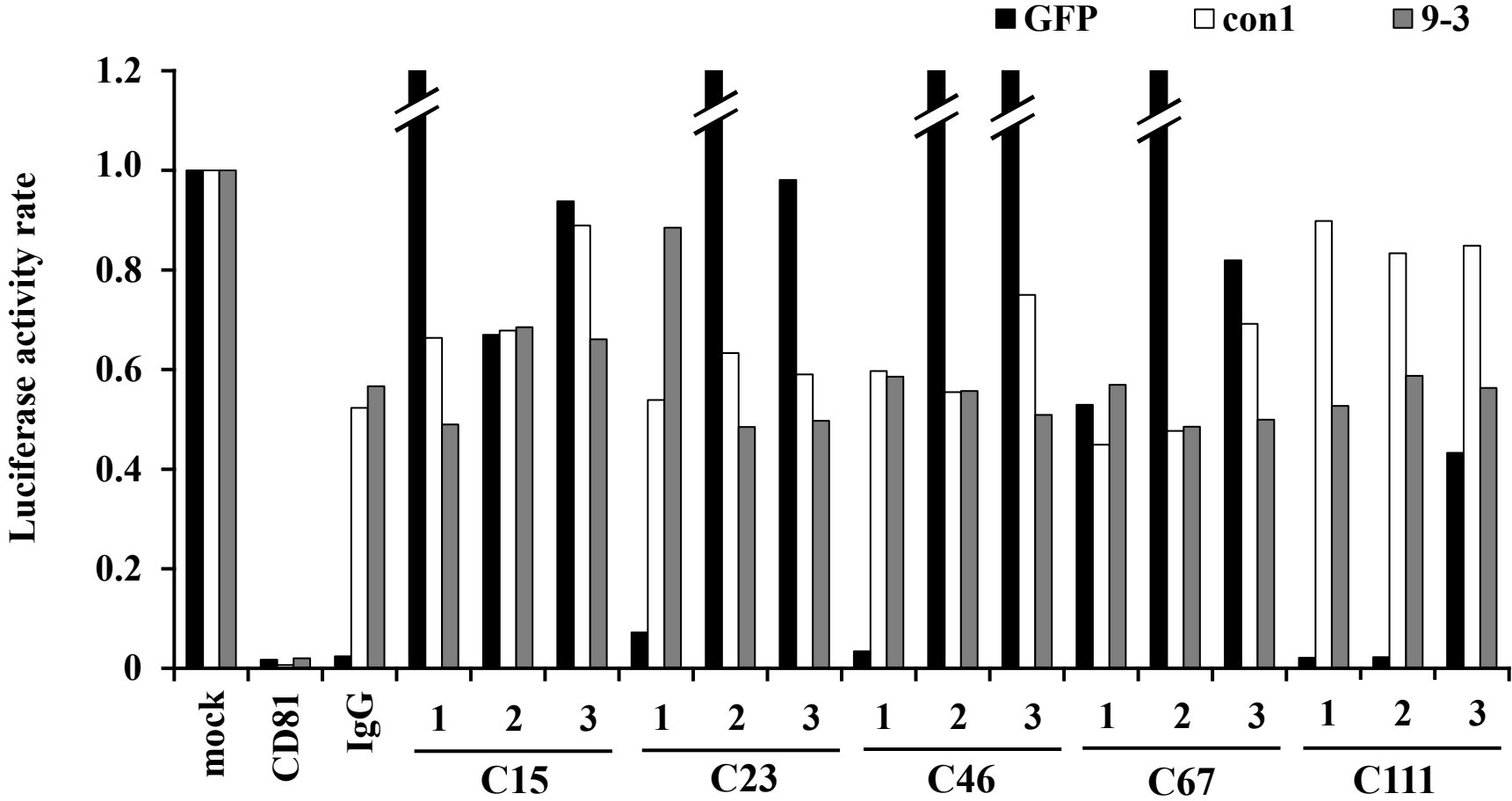
CD81	99.8 %	99.1 %
------	--------	--------

D





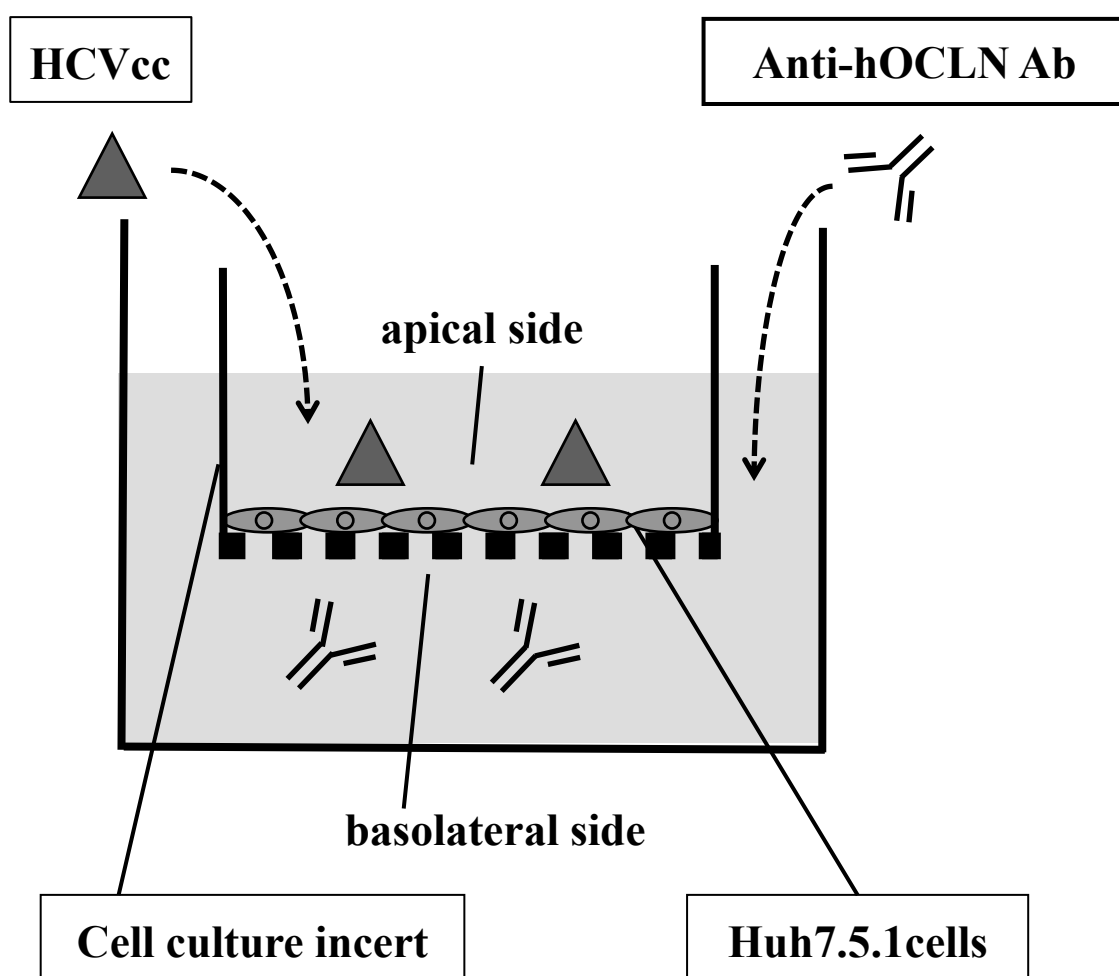
A



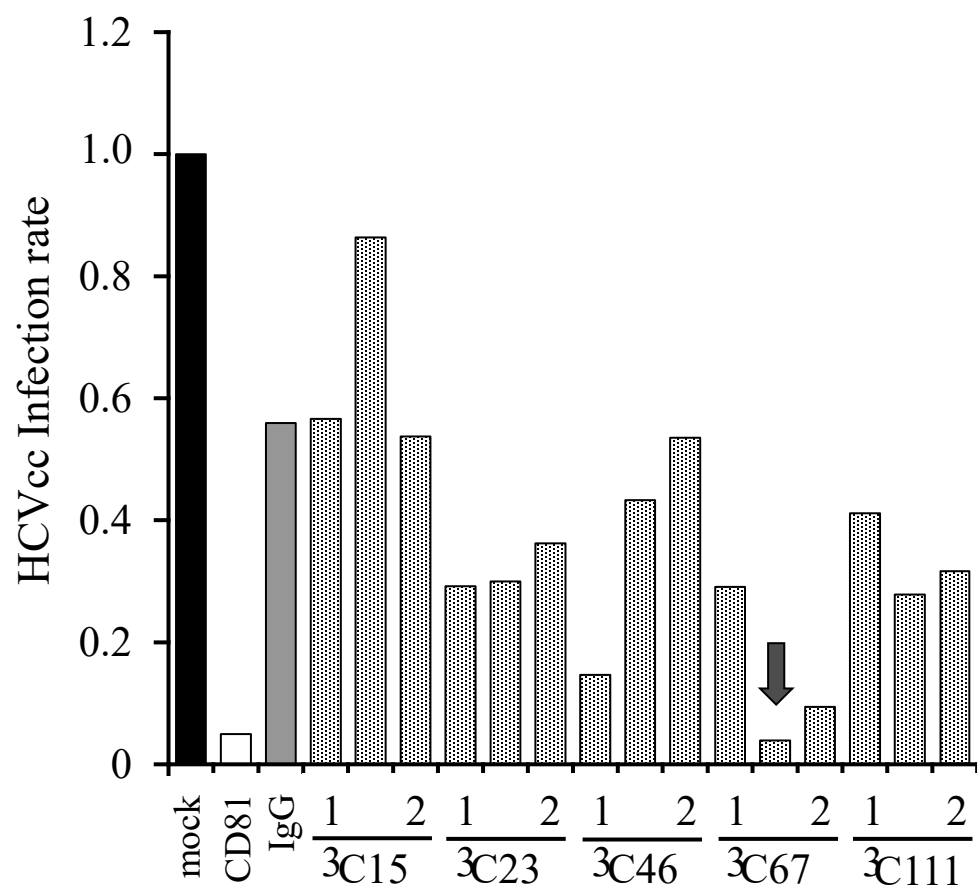
B

	con1	9-3		con1	9-3
C15-1	34 %	51 %	C67-1	55 %	43 %
C15-2	32 %	31 %	C67-2	52 %	51 %
C15-3	11 %	34 %	C67-3	31 %	50 %
C23-1	45 %	12 %	C111-1	10 %	47 %
C23-2	37 %	52 %	C111-2	17 %	41 %
C23-3	41 %	50 %	C111-3	15 %	44 %
C46-1	40 %	41 %			
C46-2	45 %	44 %	CD81	99 %	98 %
C46-3	25 %	49 %	IgG	48 %	43 %

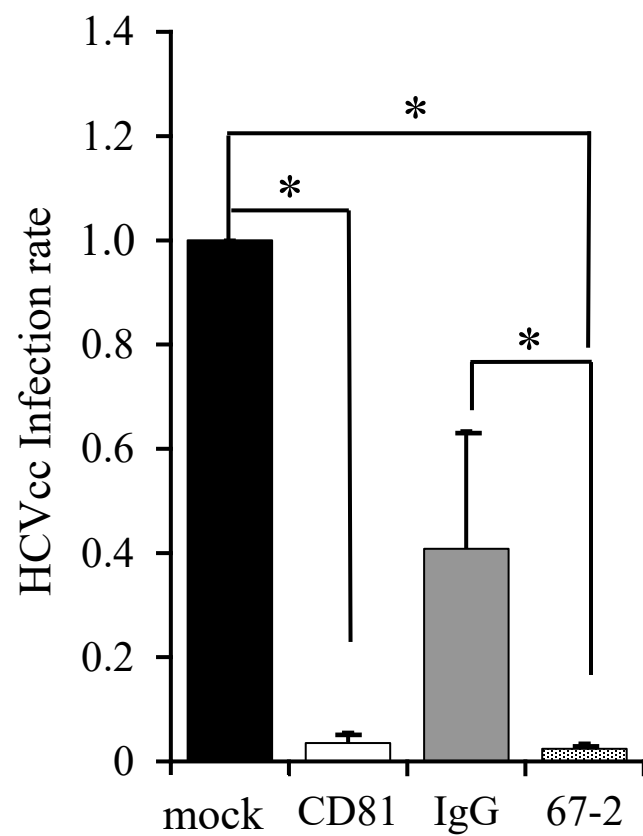
A

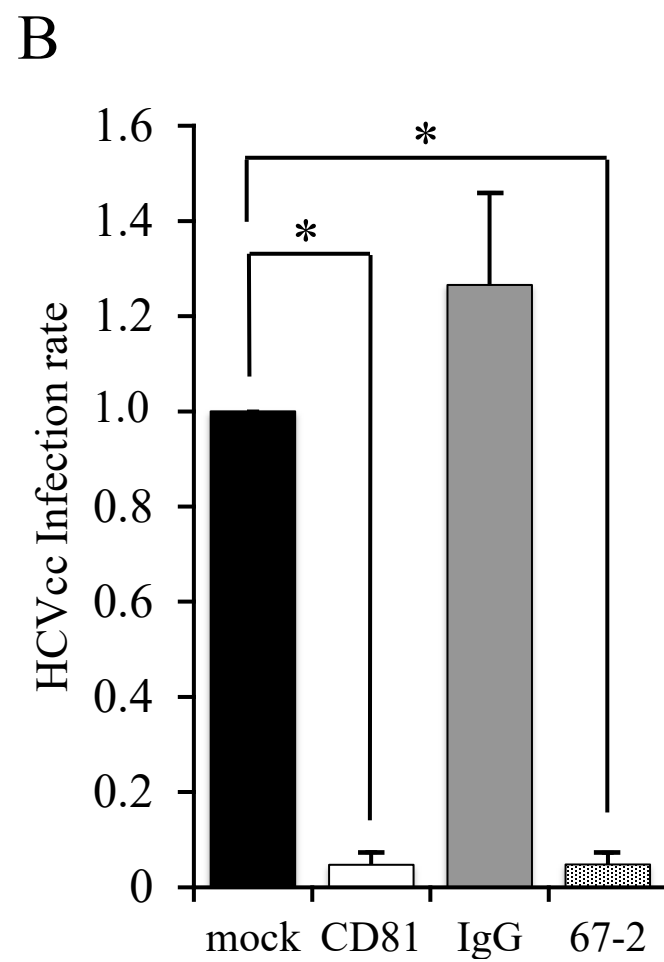
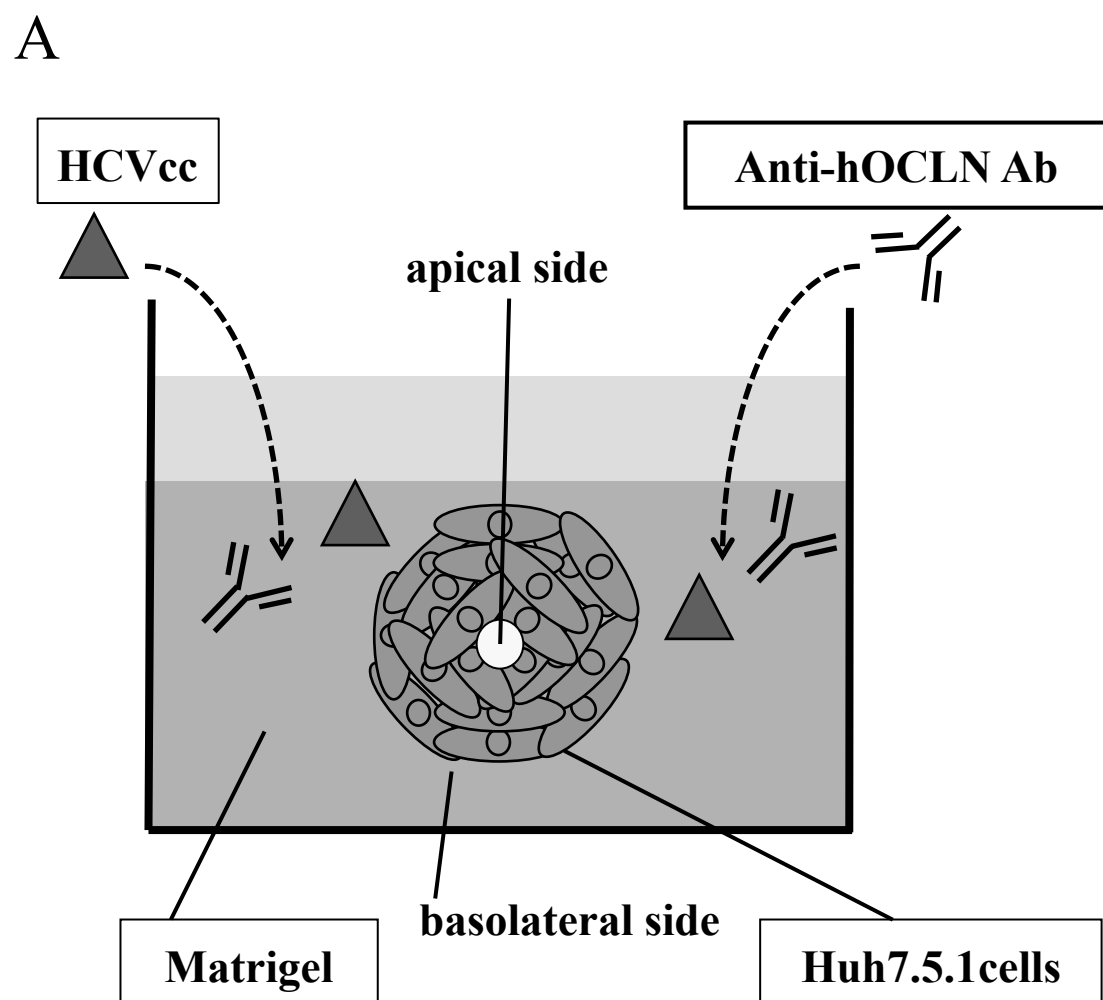


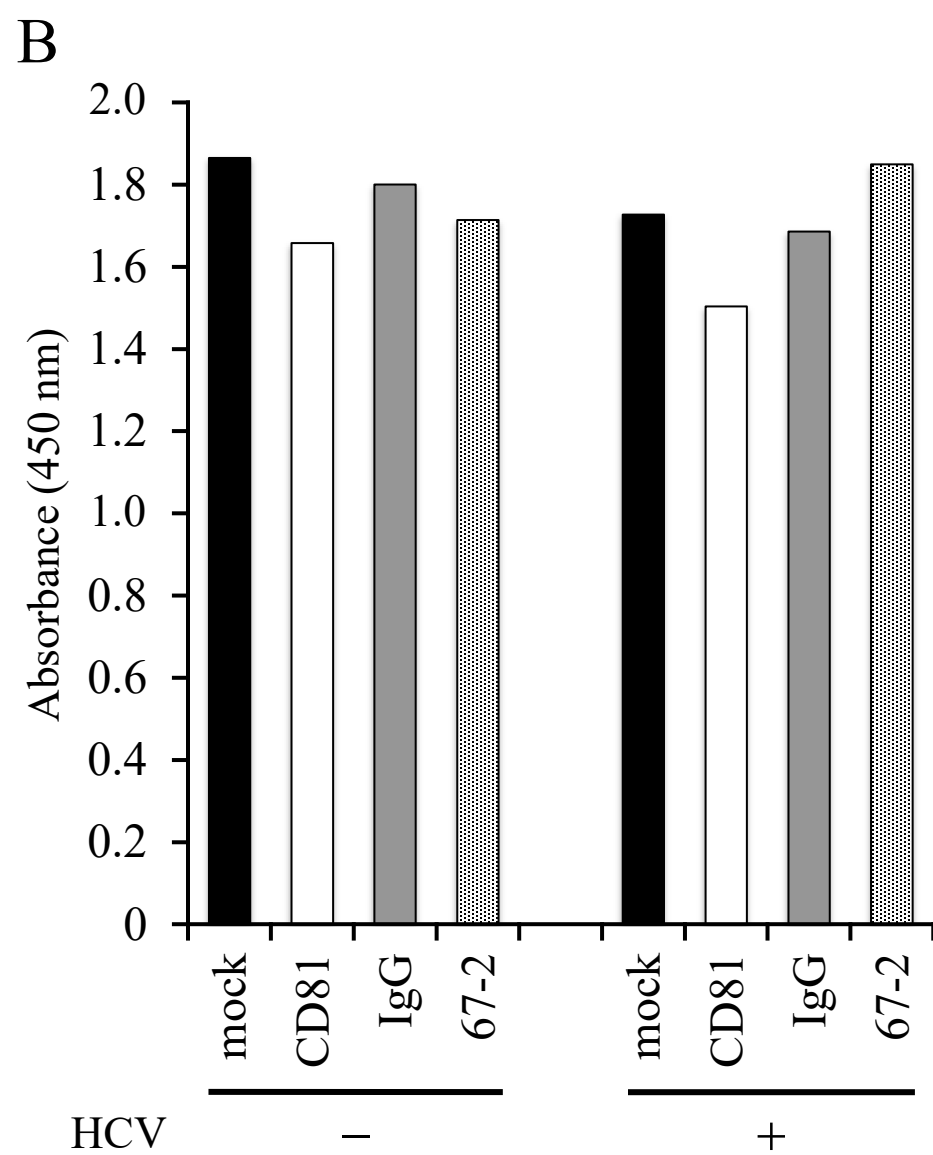
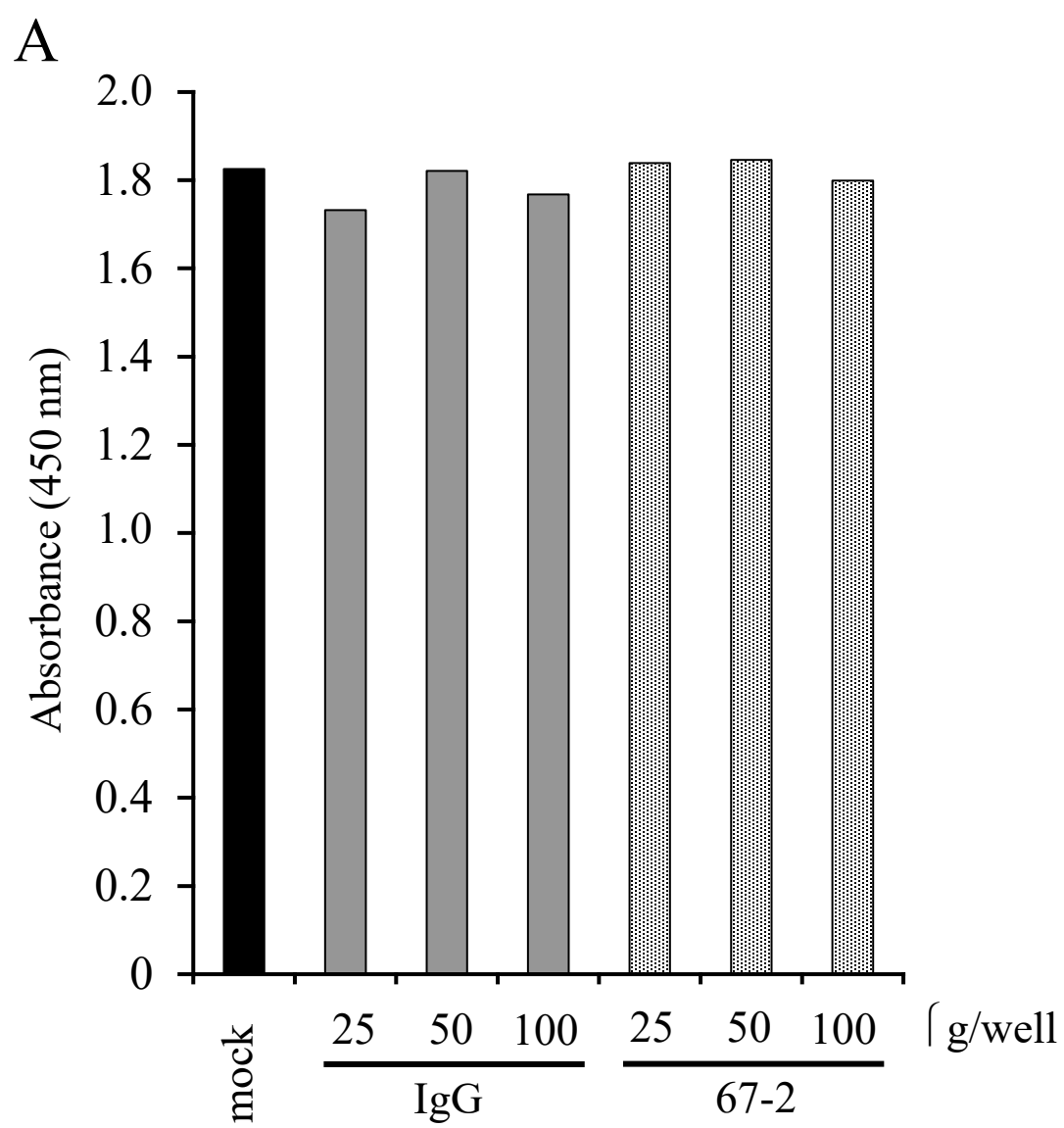
B



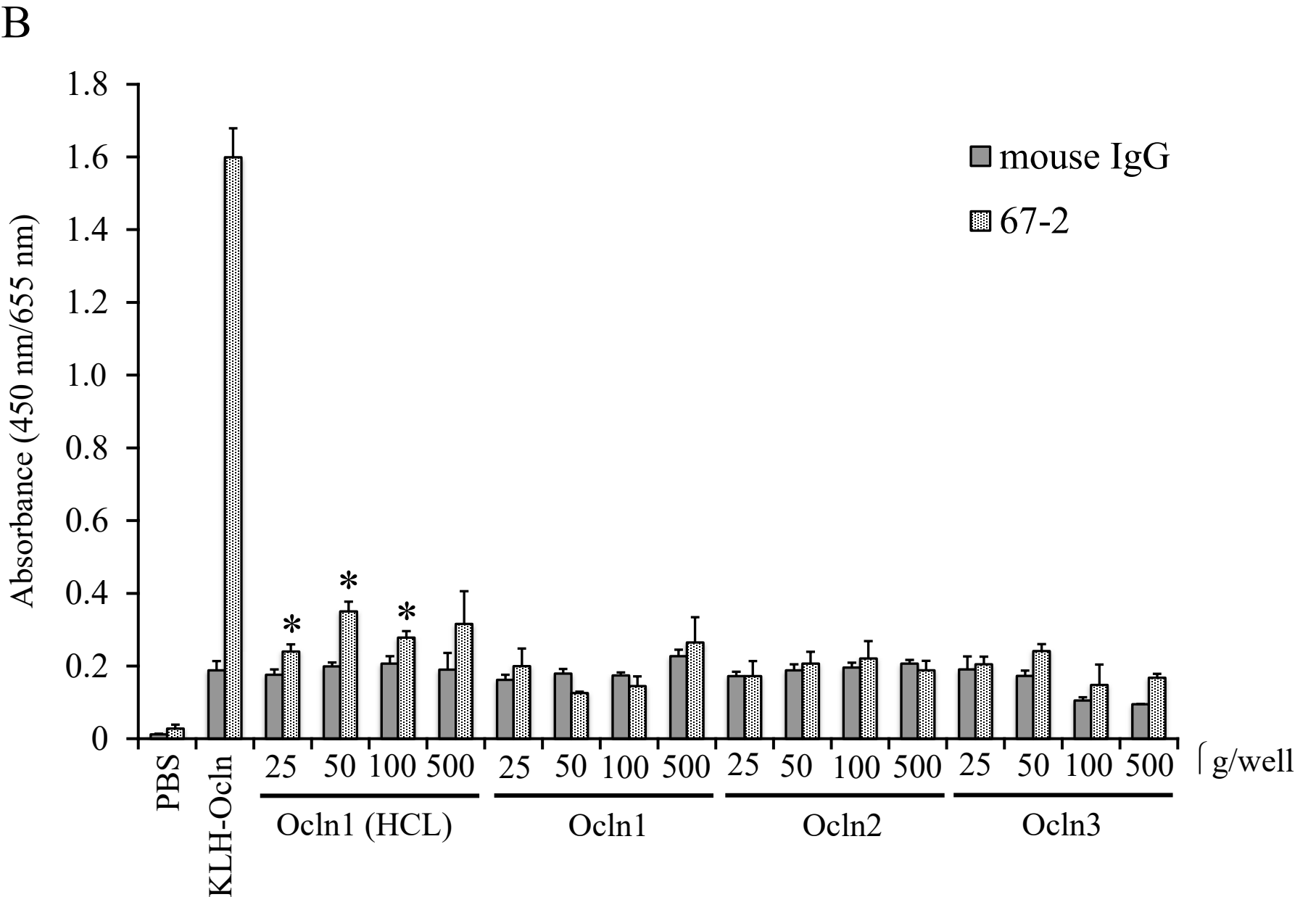
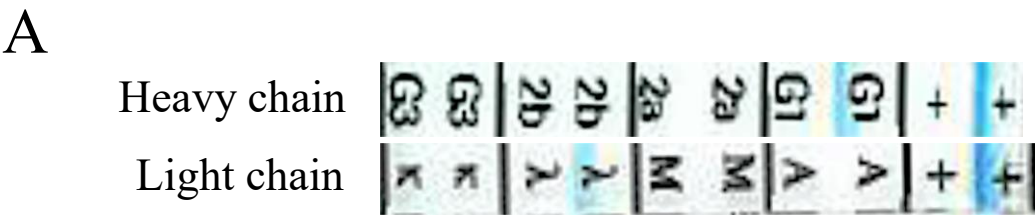
C









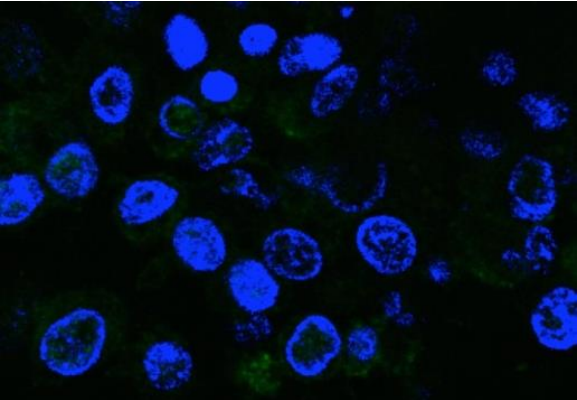
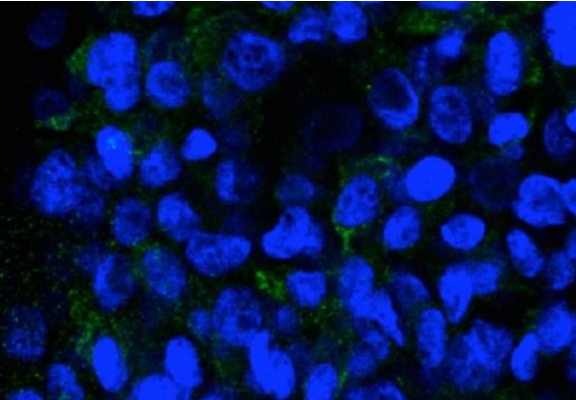


A

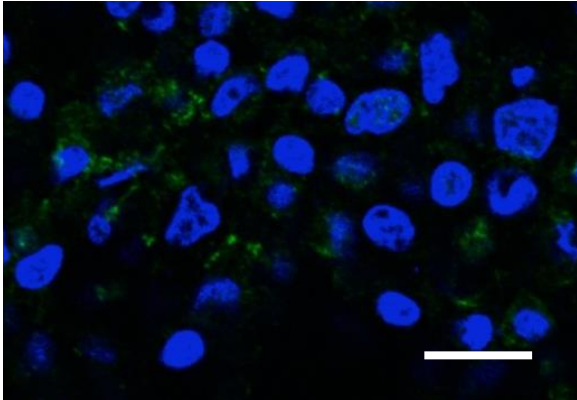
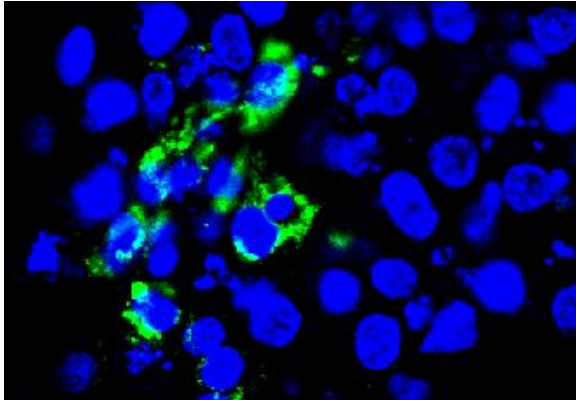
- 67-2

+ 67-2

- HCV



+ HCV

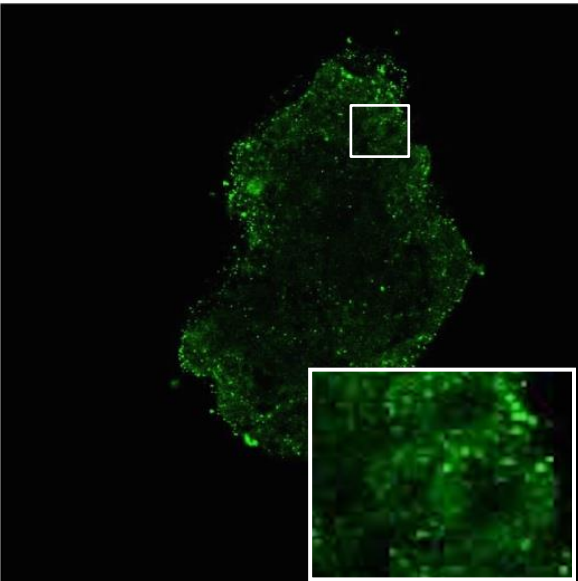
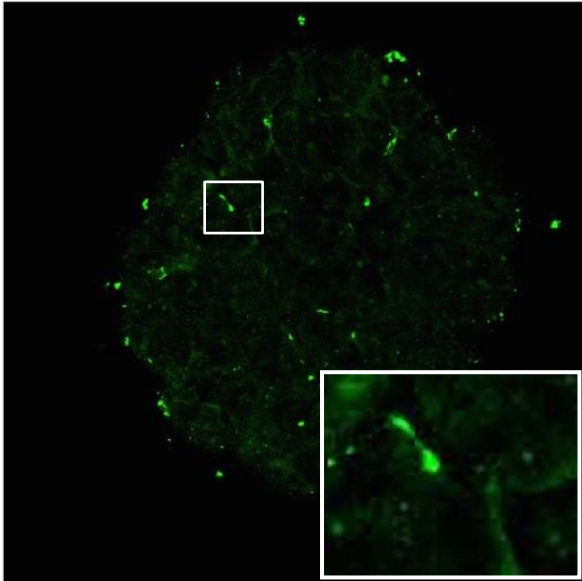


B

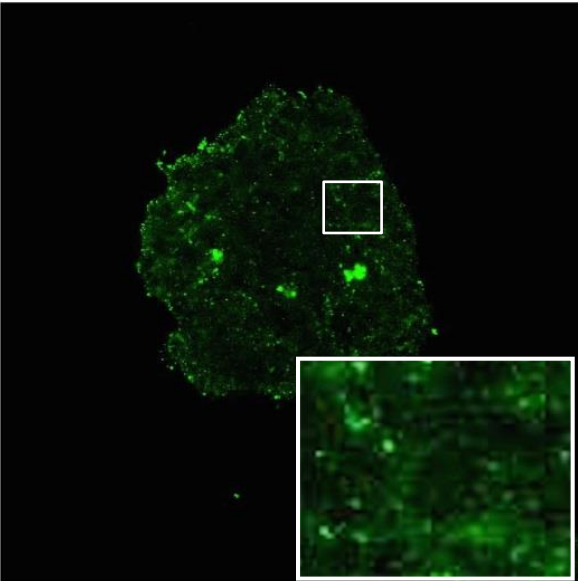
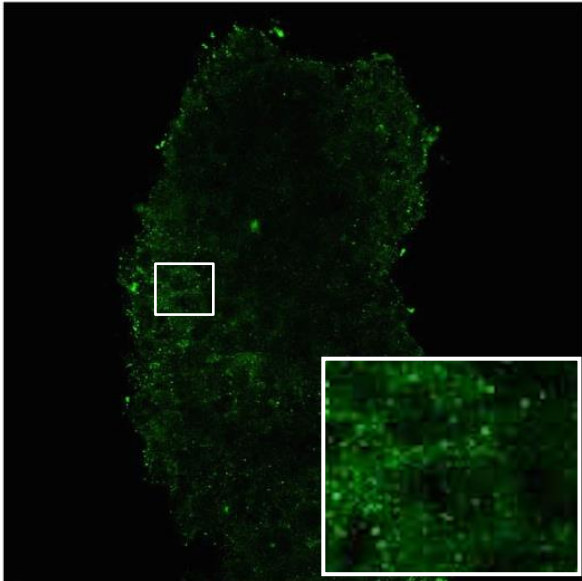
- 67-2

+ 67-2

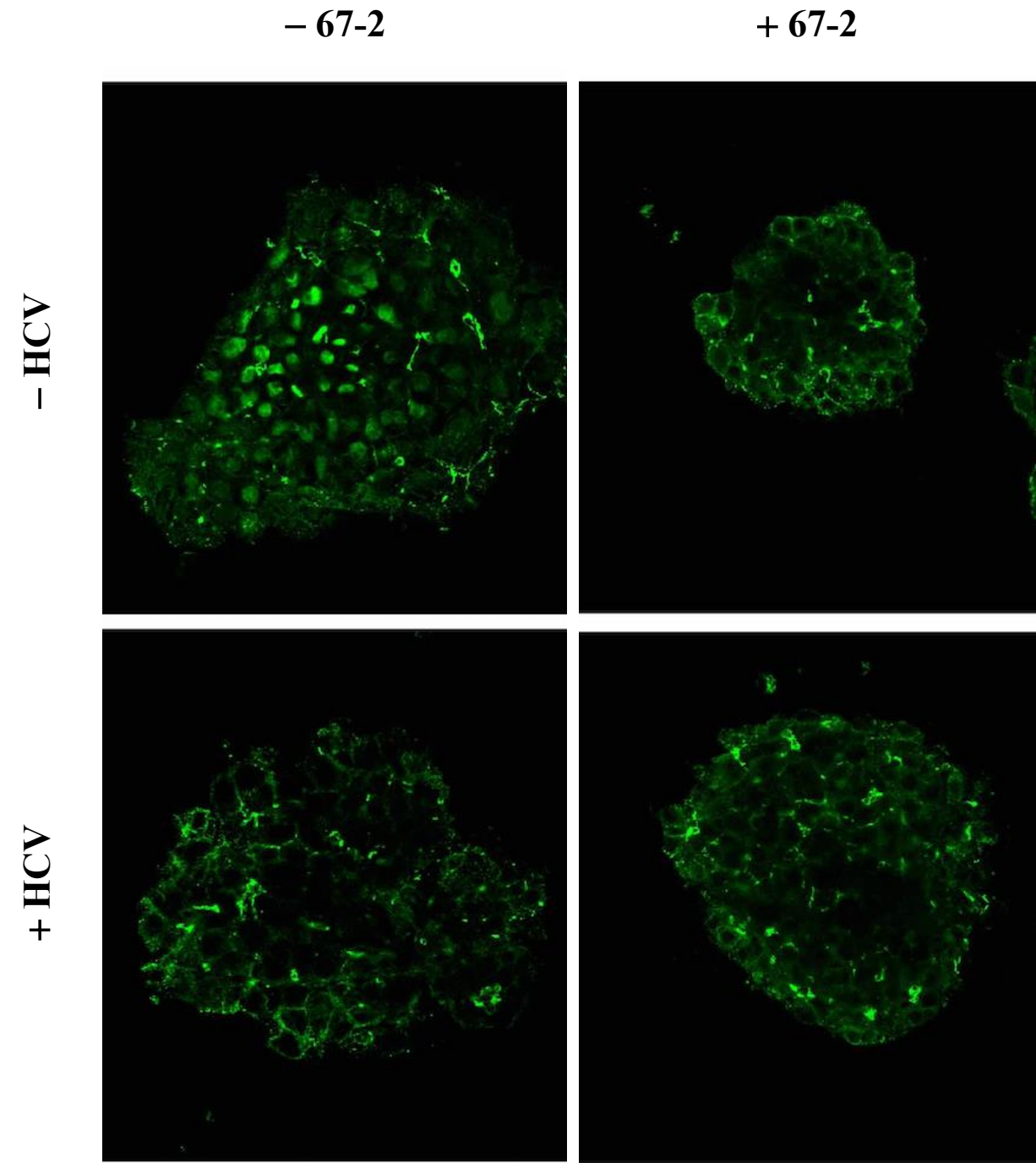
- HCV



+ HCV



C



## 図の説明

図 1. HCV の宿主侵入モデル (A)とオクルディン第 2 細胞外ドメイン(B)。

(A) HCV の感染成立には SR-BI、ヒト CD81、CLDN1、ヒト OCLN が必須である。

HCV はこれらの受容体あるいは共役受容体を順次利用して、クラスリン依存性エンドサイトーシスによって肝細胞へ侵入すると考えられている。

(B) オクルディンの第 2 細胞外ドメイン(EC2)には、6 個のヒト特異的アミノ酸が存在する。このうち 4 つのヒト特異的アミノ酸が、新規抗ヒトオクルディン単クローン抗体の抗原ペプチド配列に含まれている。

\*：ヒト特異的アミノ酸（アミノ酸番号の左右にヒト及びマウスアミノ酸を示す）

図 2. HCV 感染を阻害する抗ヒトオクルディン単クローン抗体クローンのスクリーニング。

(A) 48 well プレートで培養した Huh7.5.1 細胞に 31 種類の抗体産生クローン含有培地を 12.5  $\mu$ l/well ずつ投与し、1 時間後に HCVpv (con1 [HCV genotype 1a ], H77 [HCV genotype 1b]) 15  $\mu$ l を加え、24 時間後にルシフェラーゼ活性を定量し、mock 群を 1 とした相対値で示した。陰性対照群として培地のみ (mock)、陽性対照群として抗 CD81 抗体を 1.25  $\mu$ g/well (5  $\mu$ g/ml)投与した。四角枠は 70%以上の感染阻害率を示した 6 クローンを示している。

(B) 感染阻害傾向が認められた 6 種類の抗体産生クローンを用いて、(A)と同様に検討を行った。

(C) (B)の結果をもとに、mock の感染阻害率を 0%として 6 種類のクローンと抗 CD81 抗体の感染阻害率を算出した。

(D) 24 well プレートで培養した Huh7.5.1 細胞に対し 6 種類の抗体産生クローン含有培地を 25-100  $\mu$ l/well ずつ加え、1 時間後に HCVcc 10  $\mu$ l を投与し、2 時間後に培地交換した。24 時間後に RNA を抽出し、Real-time PCR 法により細胞中の HCV RNA を定量した。mock ならびに抗 CD81 抗体の投与は(A)と同様とした。HCVcc 感染率は mock 群を 1 とした相対値で示している。

図 3. 抗ヒトオクルディン抗体サブクローンの抗原への結合性。

5 種類のハイブリドーマを限界希釈法によりサブクローン化し(計 15 クローン)、培養上清に含まれる抗体の抗原への結合性を ELISA 法にて検討した。

Pre LD; サブクローン化前の培養上清。

図 4. 抗ヒトオクルディン抗体 15 クローンによる HCV<sub>pv</sub> 感染阻害効果。

- (A) 48 well プレートで培養した Huh7.5.1 細胞に、精製した 15 種類の抗オクルディン抗体サブクローンを 20  $\mu$ l/well (80  $\mu$ g/ml) ずつ投与し、1 時間後に HCV<sub>pv</sub> (con1 [HCV genotype 1a ], 9-3 [HCV genotype 1b]) 15  $\mu$ l を加え、24 時間後にルシフェラーゼ活性を定量し、mock 群を 1 とした相対値で示した。対照群として、培地のみ(mock)、正常マウス IgG ならびに抗 CD81 抗体を 1.25  $\mu$ g/well (5  $\mu$ g/ml) 投与した。
- (B) (A)の結果をもとに、mock の感染阻害率を 0%として 15 種類のクローンと抗 CD81 抗体ならびに正常マウス IgG の感染阻害率を算出した。

図 5. ダブルチャンバー培養系を用いた抗ヒトオクルディン抗体の HCV<sub>cc</sub> 感染阻害効果。

- (A) ダブルチャンバー培養系の模式図。Huh7.5.1 細胞はインサート半透膜上で培養し、インサート外（バソラテラル面）より各抗オクルディン抗体(計 15 クローン)100  $\mu$ g/well を加えた。1 時間後にインサート内（アピカル面）に HCV<sub>cc</sub> 5  $\mu$ l を投与し、2 時間後にインサート内外の培地交換をした。
- (B) (A)のように培養した 24 時間後に RNA を抽出し、Real-time PCR 法により細胞中の HCV RNA を定量した。コントロール群は培地のみ (mock)、正常マウス IgG (100  $\mu$ g/well)、抗 CD81 抗体 (2.5  $\mu$ g/well)とした。HCV<sub>cc</sub> 感染率は mock 群を 1 とした相対値、矢印は HCV<sub>cc</sub> 感染を顕著に阻害するクローン 67-2 を示している。
- (C) (B)と同様に HCV<sub>cc</sub> 感染阻害効果を検討した。HCV<sub>cc</sub> 感染率は mock 群を 1 とした相対値で、平均値と標準偏差を示している。\* $P < 0.001$  (n=4)。

図 6. マトリゲル 3 次元培養系を用いた抗ヒトオクルディン抗体 67-2 の HCV<sub>cc</sub> 感染阻害効果。

- (A) マトリゲル 3 次元培養系の模式図。Huh7.5.1 細胞は 24 well プレートのマトリゲル内で培養し、抗オクルディン抗体 67-2 クローンを 50  $\mu$ g/well を加えた。1 時間後に HCV<sub>cc</sub> 5  $\mu$ l を投与し、2 時間後に培地交換をした。
- (B) (A)のように培養した 24 時間後に RNA を抽出し、Real-time PCR 法により細胞中の HCV RNA を定量した。コントロール群は培地のみ (mock)、正常マウス IgG (100  $\mu$ g/well)、抗 CD81 抗体 (2.5  $\mu$ g/well)とした。HCV<sub>cc</sub> 感染率は mock 群を 1 とした相対値で、平均値と標準偏差を示している。\* $P < 0.001$  (n=5)。

図 7. 抗ヒトオクルディン抗体 67-2 による細胞傷害の評価。

- (A) Huh7.5.1 細胞は 96 well プレーートのマトリゲル上で培養し、抗オクルディン抗体 67-2 およびコントロールとして正常マウス IgG を 25、50 または 100  $\mu\text{g}/\text{well}$  加えた。Cell proliferation assay kit II (XTT) (Roche) を用い、メーカープロトコールに従って吸光度にて細胞傷害の有無を検討した。
- (B) (A)と同様の方法にて、HCVcc 感染の有無による細胞傷害度を比較した。抗オクルディン抗体 67-2 は 50  $\mu\text{g}/\text{well}$ 、コントロール群は培地のみ (mock)、正常マウス IgG (50  $\mu\text{g}/\text{well}$ )、抗 CD81 抗体 (2.5  $\mu\text{g}/\text{well}$ )とした。

図 8. HCV 感染阻害抗オクルディンヒト抗体 67-2 のエピトープ及びアイソタイプ解析。

- (A) Iso Strip マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキットを用いて、マウス抗オクルディン抗体 67-2 のアイソタイプを解析した。
- (B) 抗原として用いた KLH-Ocln peptide (1  $\mu\text{g}/\text{well}$ )をポジティブコントロールとし、各量のペプチドを ELISA 用 96 well プレーートにコートし、ELISA 法によりマウス抗オクルディン抗体 67-2 のエピトープを解析した。\* $P < 0.05$  (n=3)

図 9. HCV 感染および抗オクルディン抗体 67-2 投与に伴うオクルディンの局在変化。

- (A) マトリゲル上で培養した Huh7.5.1 細胞に抗オクルディン抗体 67-2 または正常マウス IgG を 50  $\mu\text{g}/\text{well}$  加えた。抗体投与 1 時間後に、HCVcc 存在下・非存在下で 72 時間培養し、抗 NS5A 抗体による免疫組織化学染色法にて HCV 感染の有無を検討した。バーの長さ: 25  $\mu\text{m}$ .
- (B) (A)と同様に培養、抗体投与した細胞を HCVcc 存在下・非存在下で 2 時間培養した後に、内在性オクルディンの局在変化を免疫組織化学染色法で検討した。代表的な染色性を示す部位をそれぞれ拡大表示した。
- (C) (B)と同様に培養、抗体投与した細胞を HCVcc 存在下・非存在下で 2 時間培養した後に、内在性 ZO-1 の局在変化を免疫組織化学染色法で検討した。